DIE BINDUNG BASISCHER ARZNEIMITTEL AN HUMANHÄMOGLOBIN

- Einfluß einer pH-Änderung auf das Ausmaß dieser Bindung -

Elisabeth Maucher

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
- Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Die Bindung basischer Arzneimittel an Humanhämoglobin

- Einfluß einer pH-Änderung auf das Ausmaß dieser Bindung -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Maucher

aus

Riedlingen/Wttbg.

1979

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. KURZ
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. KIESE
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 12.6.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Prof. Dr. med. H. K u r z möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. M. K i e s e, Direktor des Pharmakologischen Institus der Ludwig Maximilians-Universität München, danke ich für das Interesse an dieser Dissertation und die guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0045

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsübersicht

Seite

I. Einleitung 1

II. Methodik

A) Herstellung der Hämoglobinlösung

1. Herst. des plasmafreien Erythrozytenkonzentrats 4
2. Herst. des Hämolysats 4
3. Herst. der bei den Bindungsversuchen verwendeten Hämoglobinlösung 5

B) Dialyse

1. Verfahren und Hilfsmittel 6
2. Ansätze 7
3. Berechnung des gebundenen Anteils ß .. 9
4. Berechnung des partiellen Hämoglobinvolumens bzw. des lösenden Wasservolumens einer Hämoglobinlösung 12

C) Substanzen 13

D) Bestimmungsmethoden 15

III. Ergebnisse 16

IV. Diskussion

A) Kritik der Methodik

1. Qualitätsmängel der Membranen 20
2. Donnan - Effekt 21
3. Änderung der Eiweißkonzentration 21
4. Änderung der Substanzkonzentration ... 21
5. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle 22

B) Diskussion der Ergebnisse

1. Vergleich der Bindungsänderung mit der Änderung der Ionisation der Arzneimittel 24

Seite

2. Versuch einer Erklärung der pH-Abhängigkeit der Bindungshöhe anhand
a) des Bindungstyps im Protein-Pharmakon-Komplex 29
b) vergleichender Daten aus der Literatur 32
c) Überlegungen zu möglichen, pH-bedingten Änderungen am Proteinmolekül 35

V. Schlußfolgerungen 37

VI. Zusammenfassung 42

VII. Literatur 44

I. Einleitung

Seit Bennhold's (1938) umfassenden Arbeiten über die Vehikelfunktion der Bluteiweißkörper hat die Literatur über die Plasmaproteinbindung körpereigener und körperfremder Substanzen beträchtlich an Umfang zugenommen. Insbesondere ist es die Bindung von Pharmaka, die die Aufmerksamkeit von Untersuchern verschiedenster Disziplinen auf sich zieht und weiterhin Gegenstand aktiver Forschung bleibt (Meyer, Guttmann 1968).
Zahlreiche in vitro und in vivo Befunde liegen mittlerweile vor und demonstrieren eindrucksvoll, daß Plasmaproteinbindung eine wichtige Rolle bei der Verteilung und Speicherung von Arzneimitteln verschiedenster Stoffgruppen im lebenden Organismus spielt. Sie beeinflußt mittelbar die spezifische Wirkung, die Biotransformation und Exkretion (Keen 1965, Meyer u. Guttmann 1968, Martin 1965, Goldstein 1949, Krieglstein 1969, Bloom u. Laubach 1962) der verabreichten Pharmaka, denn nur die Konzentration des freien Arzneimittels nimmt am transmembranösen Transport teil, kann die Blut-Hirn- und die Blut-Liquor-Schranke, das Nieren- und das Darmepithel überwinden. Sie und nicht die Gesamtkonzentration des Pharmakons ist es also, die sowohl die Eliminationsrate durch Biotransformation als auch die Größe der pharmakologischen Antwort beeinflußt und damit letztlich bestimmt (Martin 1965). Dies läßt sich besonders eindrucksvoll anhand der Wirksamkeit antibakterieller Arzneimittel in An- bzw. Abwesenheit von Protein demonstrieren (Goldstein 1949).
In krassem Gegensatz zur Vielzahl der Arbeiten über die Bindung an Plasmaproteine stehen die eher spärlichen Hinweise auf die Bedeutung des Hämoglobins als Arzneimittelbindendes Protein (Schanker et al. 1961, 1962 u. 1964, Kiehs et al. 1966, Hilzenbecher 1972). Dies ist umso erstaunlicher, als die Hämoglobinkonzentration im Blut vier-

mal so hoch ist wie die des Albumins und außerdem der Bindungsvorgang demjenigen an Serumalbumin stark zu ähneln scheint, wie Kiehs et al. 1966 bei Versuchen an Rinderhämoglobin zeigen konnten. Darüberhinaus deutet alles darauf hin, daß organische Verbindungen die menschliche Erythrozytenmembran schnell und vollständig durchdringen, womit die Grundvoraussetzung für die Bindung einer Substanz an Hämoglobin - auch in vivo - gegeben wäre: So wies bereits 1931 Jacobs darauf hin, daß es keinen verbürgten Fall gibt, bei dem gezeigt werden konnte, daß eine lipoidlösliche Substanz unfähig war, in den Erythrozyten einzutreten.
In der Tat liegen mittlerweile mehrere Berichte verschiedener Autoren vor, die eindrücklich nachweisen, daß die Erythrozytenmembran gut permeabel ist, wobei die Permeationsfähigkeit mit steigender Lipoidlöslichkeit der Substanzen zunimmt und in zum Teil nicht meßbar kurzer Zeit erfolgt (Hutchinson 1962, Schanker 1964, Kiehs et al. 1966, Kurz 1970, Weckbach unveröffentlicht).
Als hauptverantwortlicher Zellbestandteil für die Bindung zeichnet Hämoglobin, wie Schanker et al. 1961 in Versuchen mit p-Nitroanilin und Serotonin zeigen konnten. Bindungsbestimmungen mit Hämoglobin wurden von Schanker 1961 und 1964, sowie von Kiehs et al. 1966 durchgeführt. Hilzenbecher (1972) untersuchte das Hämoglobin-Bindungsverhalten einer Reihe von Pharmaka und fand der Bindung an Plasmaeiweiß vergleichbare Werte.
Nun sind aber überraschend viele pharmakologisch aktive Verbindungen organische Basen oder Säuren, die im physiologischen pH-Bereich zu teilweiser Ionisation fähig sind. Dieses Verhalten ist von großer Bedeutung, da die ionisierte Form aufgrund ihrer elektrischen Ladung physikalische und chemische Eigenschaften besitzt, die von denen der ungeladenen, konjugierten Form erheblich abweichen. Inwieweit eine Änderung des Ionisationsgrades infolge unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentration des

Milieus das Bindungsverhalten organischer Substanzen an Humanhämoglobin beeinflußt, ist bisher nicht bekannt. Ziel und Aufgabe dieser Arbeit war es deshalb, am Beispiel basischer Arzneistoffe zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß eine pH-Änderung die Bindung dieser Stoffe an Humanhämoglobin beeinflußt.

II. Methodik

A) Herstellung der Hämoglobinlösung

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Hämoglobinlösung dienten Blutkonserven, die dankenswerterweise vom Bayer. Roten Kreuz, München zur Verfügung gestellt worden waren. Sie lagerten bis zu ihrer weiteren Verwendung maximal 20 Tage bei 4°C im Kühlraum.
Ca. 10 dieser Einzelkonserven zu je 0,5 l wurden jeweils gleichzeitig verarbeitet, sodaß die daraus erhaltene Hämoglobinlösung stets ein Gemisch aus den Blutfarbstoffen mehrerer Spender darstellte.

1) Herstellung des plasmafreien Erythrozytenkonzentrates

Die gemischten Blutkonserven wurden zunächst koliert, anschließend bei 2000·g 30 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma und die oben schwimmende Leukozyten- und Thrombozytenschicht wurden abgesaugt, das Erythrozytensediment mit 1/8 molarem, blutisotonem Phosphatpuffer pH 7,4 im Verhältnis 1:2 verrührt und 30 Minuten lang bei 5000·g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, der überstehende Puffer zuletzt scharf abgesaugt und die sedimentierten Erythrozyten dann in Portionen zu je 150 g bei -30°C eingefroren.

2) Herstellung des Hämolysates

Das tiefgefrorene Erythrozytenkonzentrat wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut. Dabei kam es bereits zu einer partiellen Hämolyse. Um sie zu vervollständigen wurde das Konzentrat in Portionen zu 80 - 100 ml mit einem MSE 100 Watt Ultrasonic Disintegrator 20 Minuten lang beschallt (Beschallungsfrequenz 22 kHz bei vor-

geschriebener Eintauchtiefe des Titanstabes von 1 cm, Kühlbad, abwechselnd 30 sec Beschallung, 30 sec Pause).

3) Herstellung der bei den Bindungsversuchen verwendeten Hämoglobinlösung

Die Konzentration dieser Lösung betrug bei allen Versuchen 25 ± 1 g/100 ml Hämoglobin ($\hat{=}$ $3{,}88 \cdot 10^{-3}$ molar). Die nach Beschallung vorliegende Hämoglobinkonzentration wurde mittels der Cyanidmethode nach Evelyn et al. (1938) und Havemann et al. (1939) bestimmt: Dabei wird durch Zugabe einer 10%-igen wässrigen Kaliumferricyanidlösung Hämoglobin zu Ferrihämoglobin oxidiert. Dieses wiederum bildet mit zugegebenem Kaliumcyanid einen Komplex, der das Licht bei 550 nm maximal adsorbiert.
Die so ermittelte Konzentration des Ultraschallhämolysates lag im Durchschnitt bei 30 bis 32 g Hämoglobin pro 100 ml.

Nach Leuthard (1963) beträgt die physiologische Hämoglobinkonzentration im Erythrozyten ca. 35 g/100 ml. Eine derart hoch konzentrierte Hämoglobinlösung erschwert jedoch ein exaktes Arbeiten. So wäre z.B. infolge der hohen Viskosität der Lösung ~~eine gleichmäßige~~ die Diffusion der Arzneimittelverlangsamt und deshalb die Gleichgewichtseinstellung bei der sich anschließenden Dialyse erheblich verzögert.
Da Hilzenbecher (1972) am Beispiel des Sulfadimethoxins zeigen konnte, daß ab einer Hämoglobinkonzentration von ca. 20 g/100 ml die Bindung nur mehr unwesentlich zunimmt und Toyka (1974) für Chlorpromazin zum gleichen Ergebnis kam, wurde auch für die nachfolgenden Versuche eine einheitliche Hämoglobinkonzentration von 25 ± 1 g/100 ml gewählt.

Das Ultraschallhämolysat wurde deshalb mit 1/8 molarem Phosphatpuffer auf 25 ± 1 g/100 ml verdünnt, wobei 0,5 molare $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$-Lösung (pH 4,6) bzw. 0,5 molare $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$-Lösung (pH 9,2) zur Einstellung des betreffenden pH dienten. Gegebenenfalls wurde dazu außerdem 0,1 n Natronlauge bzw. 0,1 n Salzsäure verwendet.

B) Dialyse

1. Verfahren und Hilfsmittel

Zur Bestimmung der Bindung der Substanzen an Humanhämoglobin wurde das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse in der Form angewandt, wie sie von Kurz et al. (1976/77) beschrieben worden war.
Dieses Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß es - ohne allzu großen apparativen Aufwand - die Untersuchung einer Vielzahl von Einzelproben ermöglicht.
Als semipermeable Membran dienten Visking-Dialysierschläuche Typ 8/32, mit einer Breite (flach) von 10 mm, einem Durchmesser von 7 mm, einer Wandstärke von 0,05 mm und einem mittleren Porendurchmesser von $15 - 20 \cdot 10^{-8}$ cm (Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg).
Sie wurden vor ihrer Verwendung in demineralisiertem Wasser mehrmals gewaschen, dann mit 0,8 at aufgeblasen, zugeknotet und bis zur Abfüllung in eine feuchte Kammer gestellt und dort aufbewahrt.
Die Füllungsvolumina der Schläuche betrugen grundsätzlich 10 ml.
Während die mit 1/8 molarem Phosphatpuffer gefüllten Schläuche ohne Spannung zugeknotet wurden, war es bei den mit der Hämoglobinlösung gefüllten Schläuchen notwendig darauf zu achten, daß erstens keine Luftblase im Schlauch verblieb und zweitens der Inhalt

des Schlauchs beim Verknoten unter Spannung gesetzt wurde. Nur so konnte ein störender Wassereinstrom aus der Außenflüssigkeit infolge der osmotischen Wasseranziehung der Hämoglobinlösung verhindert werden.
Die so gefüllten Schläuche tauchten in Glasröhrchen von 40 cm Länge und einer lichten Weite von 8,4 mm. Diese waren gefüllt mit Puffer bzw. Pharmakonlösung (10^{-4} molar). Ihr offenes Ende wurde mit einer Kunststoffkappe verschlossen.
Um die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts des Arzneimittels zwischen der proteinfreien- und der Hämoglobinlösung zu beschleunigen, wurden die Schläuche über einen Draht aus rostfreiem Stahl maschinell auf und ab bewegt.
Die Dialyse erfolgte im Kühlraum bei $4^{o}C$, um Eiweißveränderungen und Bakterienwachstum möglichst zu vermeiden. Ihre Dauer betrug mindestens 40 Stunden. Nach dieser Zeit kann - Hilzenbecher's Untersuchungen an Sulfadimethoxin (1972) zufolge - sicher mit der Einstellung des Dialysegleichgewichts gerechnet werden.

2) Ansätze

Eine direkte Bestimmung des an Hämoglobin gebundenen Substanzanteiles ist nicht möglich.
Seine Berechnung erfolgt aus diesem Grunde mittelbar aus zwei Größen: Der Konzentration des freien Anteils und der Gesamtkonzentration der Substanz in der Hämoglobinlösung.

Zur Ermittlung dieser Größen waren folgende Ansätze nötig:

Tabelle 1 : Erforderliche Ansätze

Ansatz	Inh. des Dialyse-schlauchs S = 10 ml	Außen-flüssigk. D = 10 ml	Konzentration der Außen-flüssigkeit	zur Best. von
I	Pu	Pu	E_o'	Blindwert des Puffers
II	Pu	Ph	E_2	Konz. der Gesamtmenge des Pharmakons
III	Hb	Pu	E_o	Blindwert des Hämogl.
IV	Hb	Ph	E_1	Konz. des freien Anteils an Ph

Die Ansätze I - III wurden je dreifach angefertigt, Ansatz IV umfaßte je nach Arzneimittel 8 - 14 Proben.
Die aus I - III erhaltenen Extinktionen wurden jeweils gemittelt.
Aus den durchschnittlich 11 Werten des IV. Ansatzes wure für jeden einzelnen unter Berücksichtigung der Mittelwerte I - III der gebundene Anteil berechnet.
Für jede Substanz wurde die Bindung an Humanhämoglobin bei drei verschiedenen pH-Werten bestimmt : bei pH 6,8, 7,4 und 8,0.

Für jede Substanz waren also mindestens dreimal 20 Dialysiersysteme erforderlich.
Als Puffer diente 1/8 molarer Phosphatpuffer der entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration.

Ermittelt wurden folgende Werte:

1) Die Substanzkonzentration in der Außenflüssigkeit nach der Dialyse (≙ Ansatz IV: Ph/Hb), korrigiert durch den Blindwert (≙ Ansatz III: Pu/Hb ≙ methodischer Fehler von Dialyse und Analyse).

2) Die Substanzkonzentration nach der Dialyse einer proteinfreien, gleich konzentrierten Substanzlösung (≙ Ansatz II: Ph/Pu), korrigiert durch den entsprechenden Blindwert (≙ Ansatz I: Pu/Pu).

Zur Erläuterung:

Pu = 1/8 molarer Phosphatpuffer des jeweiligen pH

Ph = Pharmakon, 10^{-4} molar im entspr. Puffer gelöst

Hb = Hämoglobinlösung 25 ± 1 g/100 ml

3) Berechnung des gebundenen Anteils ß

Die Berechnung des gebundenen Anteils ß erfolgte als prozentualer Anteil der gebundenen Substanz an der Gesamtkonzentration in der Hämoglobinlösung.

Die Gesamtmenge der Substanz im Dialysiersystem ohne stattgehabte Bindung (Ansatz II) muß gleich der Gesamtmenge der Substanz nach stattgehabter Bindung (Ansatz IV) sein.

1) $m_{II} = m_{IV}$

m_{II} und m_{IV} setzen sich aus folgenden Teilen zusammen:

2) $m_{II} = m_{IIa} + m_{IIi} + m_{IIs}$

wobei m_{IIa} = Menge im Außenvolumen
m_{IIi} = Menge im Schlauchvolumen
m_{IIs} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert wurde

3a) $m_{IV} = m_{IVa} + m_{IVi} + m_{IVs}$

wobei m_{IVa} = Menge im Außenvolumen nach erfolgter Bindung
m_{IVi} = Menge im Schlauchvolumen nach erfolgter Bindung
m_{IVs} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert wurde

wobei außerdem $m_{IVi} = m_f + m_g$

m_f = freie, im lösenden Wasservolumen gelöste Menge
m_g = an Hämoglobin gebundene Menge

Damit ergibt sich aus Gleichung 3a)

3b) $m_{IV} = m_{IVa} + m_f + m_g + m_{IVs}$

Da $m_{IIs} = m_{IVs}$ ergibt sich aus den Gleichungen 1), 2) und 3b) für die gebundene Menge

4) $m_g = m_{IIa} + m_{IIi} - m_{IVa} - m_g$

Die entsprechenden Konzentrationen c ergeben sich durch Division der Mengen durch die Volumina, in denen sie gelöst sind.
Das lösende Volumen V_a der Außenflüssigkeit ist in allen vier Ansätzen gleich groß und identisch mit dem pipettierten Volumen D.
Das lösende Volumen V_i des Schlauchinhaltes stimmt nur in den Ansätzen I und II mit dem pipettierten Volumen S überein und ist gleich groß V_a.
In den Ansätzen III und IV entspricht das lösende Wasservolumen V_{LW} nicht dem pipettierten Volumen S. Dieses ist vielmehr um das Volumen des Hämoglobinanteiles vermindert (Berechnung des partiellen Hämoglobinvolumens s.u.).

Somit entsprechen den auf der rechten Seite der Gleichung 4) angegebenen Mengen folgende Konzentrationen:

$$5a)\quad c_{IIa} = \frac{m_{IIa}}{V_a} \qquad 5b)\quad c_{IIi} = \frac{m_{IIi}}{V_i}$$

$$5c)\quad c_{IVa} = \frac{m_{IVa}}{V_a} \qquad 5d)\quad c_f = \frac{m_f}{V_{LW}}$$

Nach Einstellung des Dialysegleichgewichts in den Ansätzen II und IV gleichen einander auch die entsprechenden Konzentrationen:

$$6a)\quad c_{IIa} = c_{IIi} \quad u. \qquad 6b)\quad c_f = c_{IVa}$$

Damit lautet Gleichung 4) :

$$7)\quad m_g = 2 \cdot c_{IIa} \cdot V_a - c_{IVa} \cdot V_a - c_{IVa} \cdot V_{LW}$$

Wird die gebundene Substanzmenge als Bruchteil der Gesamtmenge im Schlauch des Ansatzes IV ausgedrückt, so erhält man für die Bindung:

$$B = \frac{m_g}{m_f + m_g}$$

Mit den Gleichungen 5d), 6b) und 7) läßt sich B folgendermaßen ausdrücken:

$$B = 1 - \frac{c_{IVa} \cdot V_{LW}}{V_a \, (2c_{IIa} - c_{IVa})}$$

Die Konzentrationen ergaben sich aus den Extinktionen, wobei von E_1 die Extinktion des Blindwertes E_o und von E_2 diejenige des Blindwertes E_o' abgezogen werden mußte. Da die Extinktionsmessungen in einem Bereich vorgenommen wurden, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist, war es möglich, mit den relativen Werten der Extinktionen zu rechnen.

Bei Multiplikation von B mit dem Faktor 100 und unter Berücksichtigung, daß $V_a = D = 10$ ml beträgt, ergibt sich der gebundene Anteil ß in Prozent zu:

$$10) \quad ß = 100 - \frac{V_{LW} \, (E_1 - E_o)}{20 \, (E_2 - E_o') - 10 \, (E_1 - E_o)} \cdot 100 \; \%$$

Der freie Anteil beträgt 100 - ß (%).

4) Berechnung des partiellen Hämoglobinvolumens bzw. des lösenden Wasservolumens einer Hämoglobinlösung

nach Netter (1959)

Gibt man 1 g eines trockenen Proteins zu einer Lösung, so erfährt diese eine Volumenzunahme von V'. V' entspricht dabei dem spezifischen Volumen eines Proteins und hat die Dimension ml/g. Für Hämoglobin beträgt es 0,749 ml/g.
Multipliziert man diese Größe mit der Hämoglobinmenge in g, die in einem bestimmten Volumen enthalten ist, so erhält man das partielle Hämoglobinvolumen, d.h. dasjenige Volumen, das von den Proteinmolekülen selbst eingenommen wird.
Nach Subtraktion des partiellen Hämoglobinvolumens vom Gesamtvolumen der Lösung erhält man das lösende Wasservolumen V_{LW}.

Bei der verwendeten Hämoglobinlösung von 25 $\pm$ 1 g/100 ml errechnet sich das Volumen des Lösungswassers wie folgt:

$$0{,}749 \text{ ml/g} \cdot 2{,}5 \text{ g} = 1{,}87 \text{ ml}$$

Das lösende Wasservolumen beträgt mithin $V_{LW} = 8{,}13$ ml.

C) Substanzen

Die zur Untersuchung herangezogenen Arzneimittel - durchweg organische Basen - wurden zur Bestimmung ihrer Bindung der Außenflüssigkeit des Dialysiersystems in isomolaren Konzentrationen (10^{-4} molar) zugesetzt.

Die Konzentrationsangabe bezieht sich stets auf die zu Beginn der Dialyse zugegebene Pharmakonmenge, verteilt im Volumen des 1/8 molaren Phosphatpuffers vom jeweils interessierenden pH.

Die Substanzen wurden in wenig demineralisiertem Wasser zunächst gelöst, dann unter stetigem Rühren der entsprechenden Pufferlösung portionsweise zugesetzt. Damit konnte ein Ausfallen der Arzneistoffe verhindert werden.

Die pH-Abhängigkeit der Bindung basischer Arzneistoffe an Humanhämoglobin wurde anhand folgender Substanzen untersucht:

Tabelle 2: Zusammenstellung der untersuchten Arzneistoffe

Substanz	Mol.Gew.	VK
Promethazin	320	266
Promazin	382	357
Chlorpromazin	355	350
Desipramin	302	7.05
Toloniumchlorid	306	---
Chinin	397	0.082
Aminophenazon	231	0.21
Thiazinamium	410	---

Verteilungskoeffizienten VK (Octanol/Wasser): Arbeitskreis Prof. Kurz. VK Promazin:Staab, Krieglstein (1970).

D) Bestimmungsmethoden

Die Bestimmung der Substanzkonzentration erfolgte nach Einstellung des Dialysegleichgewichts auf photometrischem Wege.
Die Messung der Extinktion konnte in den meisten Fällen erst nach Abtrennung störender Beimengungen erfolgen.
Zu diesem Zweck wurden die basischen Arzneistoffe aus einer Probe der Außenflüssigkeit nach Alkalisieren in ein Lipidlösungsmittel (Heptan, Petroläther, Chloroform, 1,2 Dichloräthan) extrahiert und anschließend in Säure reextrahiert. Die Extinktion dieser sauren Lösung wurde dann bei der vorgeschriebenen Wellenlänge gemessen.

Im einzelnen wurden folgende Nachweismethoden angewandt:

PROMETHAZIN, PROMAZIN und CHLORPROMAZIN wurden nach der Methode von Salzmann und Brodie (1956) bestimmt.

DESIPRAMIN wurde nach Alkalisieren mit 0,1 n NaOH in Petroläther extrahiert und anschließend in 0,1 n HCl reextrahiert und bei 250 nm bestimmt.

TOLONIUMCHLORID (ToluidinblauO) zeigt nach Ansäuern mit 0,1 n HCl ein Extinktionsmaximum im sichtbaren Bereich des Lichtes und wurde bei 595 nm gemessen.

CHININ wurde nach der Methode von Josephson et al. (1947) bestimmt.

AMINOPHENAZON wurde nach Brodie und Axelrod (1950) bestimmt,

THIAZINAMIUM nach der Methode von Thieme (1956).

III. Ergebnisse

Die bei pH 6,8, 7,4 und 8,0 erhaltenen Bindungswerte der untersuchten basischen Arzneimittel sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.
Jeder diser Werte stellt den Mittelwert aus 8 - 23 Einzelbestimmungen (n) dar. Er gibt den gebundenen Anteil der Substanz (Bindg.) in Prozent der Gesamtkonzentration - ergänzt durch den mittleren Fehler des Mittelwertes (standard error $s_{\bar{x}}$) - an. Zusätzlich sind der ionisierte Anteil der Substanzen (Ionis.) bei pH 6,8, 7,4 und 8,0, sowie ihre pK_a-Werte aufgeführt.
Die Buchstaben unter den pK_a-Werten verweisen auf die jeweils zitierte Literatur und bedeuten im einzelnen:

A Aaron (1961)
G Green (1967)
M Marshall (1955)
P Perrin (1965)
S Schanker et al. (1957)

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mittels der Varianzanalyse und dem multiplen t-Test

Die Frage, ob zwischen den gemittelten Bindungswerten der verschiedenen pH-Stufen überhaupt ein Unterschied besteht, kann nach der Varianzanalyse wie folgt beantwortet werden:
Für alle untersuchten Pharmaka mit Ausnahme des Aminophenazons wird - mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1% - die Nullhypothese (alle Gruppen sind gleich) abgelehnt.

Die globalen Unterschiede werden mit dem multiplen t-Test als Einzeltest weiter geprüft, indem die

Mittelwerte paarweise miteinander verglichen werden.
Die Aussagen s - signifikant und
ns = nicht signifikant
basieren auf dem 5% Signifikanz-Niveau.

Herrn Dipl. Math. G. Ohmayer danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse.

Tabelle 3: Zusammenstellung der bei drei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen ermittelten Bindungswerte.

Substanz		pH 6,8	7,4	8,0	pK_a
PROMETHAZIN	Ionis.	99,4%	97,6%	91,1%	9,0
	Bindg.	83,9%	88,3%	92,6%	M
	$s\bar{x}$	0.29	0.20	0.32	
	n	9	9	9	
	Signifik.	s	s		
PROMAZIN	Ionis.	99,8%	99,2%	97,1%	9,5
	Bindg.	91,1%	92,3%	93,5%	M
	$s\bar{x}$	0.13	0.09	0.18	
	n	10	8	9	
	Signifik.	s	s		
CHLORPROMAZIN	Ionis.	99,7%	98,8%	95,2%	9,3
	Bindg.	94,2%	94,7%	95,0%	M
	$s\bar{x}$	0.13	0.12	0.12	
	n	8	10	11	
	Signifik.	-	ns		

Substanz	pH	6,8	7,4	8,0	pK_a
DESIPRAMIN	Ionis.	99,9%	99,8%	98,5%	10,2
	Bindg.	80,3%	86,5%	88,1%	G
	$s\bar{x}$	0.36	0.32	0.25	
	n	10	10	9	
	Signifik.		s	s	
TOLUIDINBLAU	Ionis.	83,4%	55,9%	24,1%	7,5
	Bindg.	63,2%	68,7%	73,9%	P
	$s\bar{x}$	0.22	0.25	0.24	
	n	15	11	13	
	Signifik.		s	s	
CHININ	Ionis.	97,6%	90,9%	71,5%	8,4%
	Bindg.	61,4%	66,1%	70,9%	A
	$s\bar{x}$	0.22	0.30	0.30	
	n	11	12	12	
	Signifik.		s	s	
AMINOPHENAZON	Ionis.	1,5%	0,4%	0,1%	5,1
	Bindg.	2,2%	1,6%	1,5%	S
	$s\bar{x}$	0.54	0.49	0.48	
	n	8	9	10	
	Signifik.		ns	ns	
THIAZINAMIUM	Ionis.	99,9%	99,9%	99,9%	11,2
	Bindg.	40,0%	61,1%	61,5%	M
	$s\bar{x}$	0.68	0.64	0.47	
	n	17	19	23	
	Signifik.		s	ns	

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Bei nahezu allen untersuchten basischen Arzneistoffen nimmt das Ausmaß der Bindung mit steigendem pH zu.

2. Thiazinamium weist lediglich zwischen pH 6,8 und 7,4 ein signifikant erhöhtes Bindungsverhalten auf. Zwischen pH 7,4 und 8,0 bleibt die Bindungshöhe jedoch konstant.

3. Ein ähnliches - wenn auch zahlenmäßig wesentlich geringer ausgeprägtes - Verhalten zeigt Chlorpromazin, dessen Bindungsausmaß sich ebenfalls nur zwischen pH 6,8 und 7,4 signifikant ändert.

4. Aminophenazon dagegen zeigt keinerlei Abhängigkeit seiner Bindung von der jeweils herrschenden Wasserstoffionenkonzentration.

IV. Diskussion

A) Kritik der Methodik

Zur Untersuchung der Bindung niedermolekularer Substanzen an Eiweißkörper werden im wesentlichen vier verschiedene Methoden angewandt: Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation, Ultrafiltration und Gelfiltration (Krieglstein 1969).
Eine - bei Beachtung gewisser Einschränkungen - gute Übereinstimmung der auf unterschiedlichem Wege gewonnenen Ergebnisse wird von mehreren Autoren berichtet (Bruck und Kuhne 1962, Scholtan 1965, Krieglstein 1970, Kurz et al. 1977).

Die älteste Methode zur Bestimmung der Proteinbindung stellt die Gleichgewichtsdialyse dar. Sie weist die geringste Störung des labilen Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Anteil auf. Die durch sie erhaltenen Ergebnisse kommen somit den wahren Bindungswerten am nächsten (Kurz 1970). Darüberhinaus ermöglicht dieses Verfahren die Untersuchung einer Vielzahl von Einzelproben ohne allzu großen apparativen Aufwand - allerdings mit dem Nachteil einer relativ langen Untersuchungsdauer.

Von Garn und Kimbel (1961) werden für die Dialysemethode folgende Einschränkungen angegeben, die zu einer Minderung des Aussagewertes der Ergebnisse führen können:

1. Qualitätsmängel der Membranen

   Adsorption der Substanzen an die Dialysemembran
   Die eingesetzten Cellulose-Schläuche lassen niedermolekulare Substanzen wie die untersuchten Pharmaka nicht nur durch ihre Poren diffundieren, sondern adsorbieren sie auch in wechselndem Ausmaß. Hilzenbecher (1972) untersuchte die Adsorption einer Reihe von Substanzen an die Dialysemembran und fand Werte zwischen 0 und 53,7%, wobei diese Werte überdies bei ein und derselben Substanz von Ansatz zu Ansatz schwankten (vgl. Desipramin 0,8 - 13,3%, Promazin 6,9%, Toloniumchlorid 53,7%). Eine dadurch bedingte Störung der Bindung ist dennoch nicht zu erwarten, da die möglicherweise eintretende Adsorption durch einen entsprechenden Kontrollansatz (Ph/Pu) korrigiert wird.

2. Donnan-Effekt

Dieser ist bei Dialysierversuchen in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Hämoglobin (nach Rauen bei pH 6,87, nach Antonini et al. bei pH 7,1 - 7,2) zu vernachlässigen (Garn und Kimbel 1961).

3. Veränderung der Eiweißkonzentration

Einer Verdünnung der Hämoglobinlösung infolge osmotischer Wasseranziehung während der Dialyse wurde durch Verknoten unter Druck bei Vermeidung jeglicher Luftblase im Schlauch entgegengewirkt. Wie durch Wiegen der Schläuche vor und nach der Dialyse festgestellt wurde, traten nach erfolgter Dialyse Gewichtsabweichungen nur bis maximal $\pm$ 0,3 g auf.
Ein merklicher Einfluß auf das Bindungsvermögen sowie die Konzentration des Arzneistoffes in der Außenflüssigkeit ließ sich in keinem der kontrollierten Fälle nachweisen.

4. Änderung der Substanzkonzentration

Bei der Dialyse ändert sich die Gesamtkonzentration des Pharmakons. Sie wird nach Erreichen des Gleichgewichts niedriger sein.
Da aber das Ausmaß der Bindung von der Gesamtkonzentration abhängt, gelten die ermittelten Bindungswerte streng genommen nur für die am Ende der Dialyse vorhandene Konzentration.
Parallelversuche mit der zwei-, drei- und fünffachen Konzentration am Beispiel des Chinins ergaben lediglich um 1,0, 1,3 bzw. 1,2% verringerte Bindungswerte.

5. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle

Sie erscheint unwahrscheinlich, da sich nach Zugabe des Pharmakons zur Außenlösung dasselbe Gleichgewicht einstellt wie nach Zugabe zur Hämoglobinlösung; ein ungehinderter Durchtritt der Substanz in beide Richtungen also möglich ist.

Eiweißlösungen wie die verwendete Hämoglobinlösung sind nicht unbegrenzt haltbar. Bei längerer Lagerung könnte sich infolge Veränderungen am Eiweiß dessen Bindungskapazität verändern. Scholtan (1961) hat dies in der Tat am Beispiel der Serumproteine zeigen können, wo nach 22-tägigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur für das von ihm untersuchte Sulfonamid ein Bindungsverlust von 70% auftrat. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Baur, Kurz und Trunk (1976, im Druck).
Demgegenüber fand Kiehs (1965), daß Hämoglobin, welches mehrere Wochen bei 0°C luftgeschützt aufbewahrt wurde, keinen Rückgang seiner Bindungskapazität zeigte.
Auch scheint nur ein unwesentlicher Unterschied im Bindungsvermögen von reduziertem, oxidiertem und Methämoglobin zu bestehen, wie Schönborn (1965) an Beispielen zeigen konnte.
Dies würde bedeuten, daß es vermutlich nicht von entscheidender Bedeutung ist, daß alles Hämoglobin in der nicht-oxidierten Form vorliegt.
Durch das Einfrieren der Erythrozyten war eine Änderung ihres Hämoglobin-Bindungsverhaltens nicht zu erkennen; auch zeigte sich - was die Permeationsfähigkeit anbetrifft - kein Unterschied zwischen gelagerten und frischen Erythrozyten (Schanker et al 1961).
In der für die Dialyse erforderlichen langen Untersuchungsdauer könnten allerdings eine mikrobielle Besiedelung stattfinden und chemische Veränderungen

an den Substanzen auftreten.
Diese Vorgänge lassen sich jedoch beim Arbeiten im Kühlraum (4°C) wesentlich hinauszögern.
pH-Kontrollen vor und nach der 40-stündigen Dialyse ergaben Übereinstimmung.

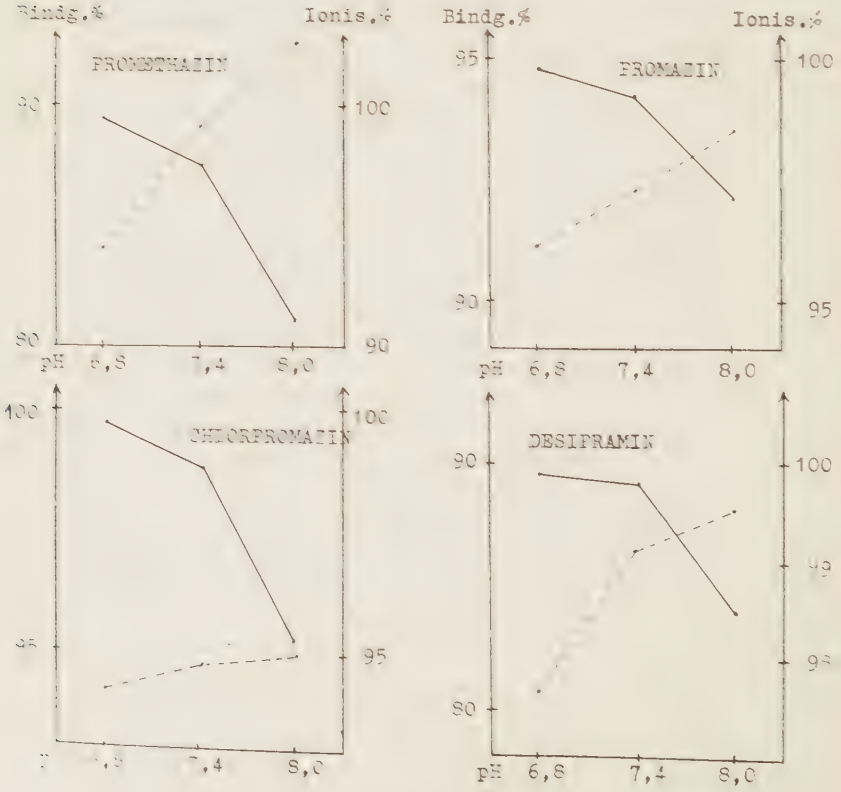
In den ersten Versuchsreihen wurde versucht, mit reinen Hämoglobinlösungen zu dialysieren.
Um das durch Ultraschall gewonnene Hämolysat von - ebenfalls Pharmakon-bindenden - Stromata und Membrananteilen der Erythrozyten zu befreien, wurde dieses portionsweise bei 18 000 U/min zentrifugiert, die Hämoglobinlösung von den abgeschiedenen Membranen vorsichtig abgesaugt.
Eine so erhaltene Hämoglobinlösung wies jedoch, wie am Beispiel des Chlorpromazins gezeigt werden konnte, ein nur unwesentlich verringertes Bindungsvermögen (93,3% statt 94,7% bei pH 7,4) auf.
Schanker (1961) fand - zum Vergleich - für Nitroanilin eine Bindung an die Stromata in Höhe von 3%.
Der Anteil der Stromata bzw. Membranen ist im übrigen sehr gering, denn mehr als 90% der Erythrozytentrockensubstanz bestehen nach Frick (1961) aus Hämoglobin.
Der Einfluß dieser Bestandteile auf die Bindung wurde deshalb in allen weiteren Untersuchungen vernachlässigt.

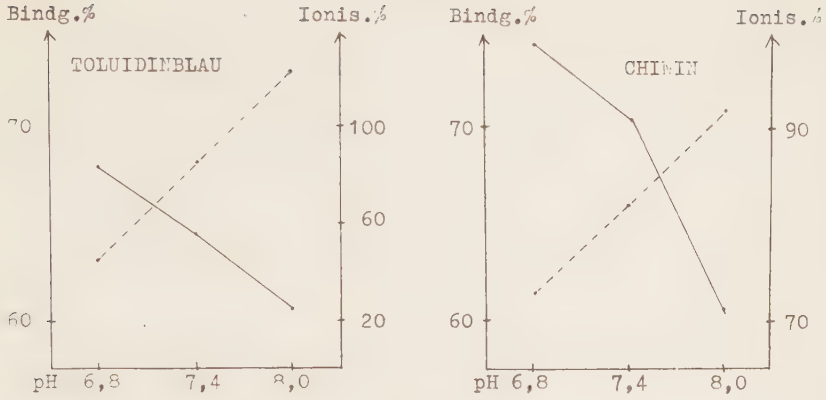
B) Diskussion der Ergebnisse

1. Vergleich der Bindungsänderung mit der Änderung der Ionisation der Arzneimittel

a) Diejenigen basischen Arzneistoffe, die zwischen pH 6,8 und 8,0 ihre Ionisation ändern, zeigen auch ein pH-abhängiges, unterschiedliches Bindungsverhalten: Mit steigendem pH sinkt das Ausmaß ihrer Ionisation, ihre Bindung an Hämoglobin nimmt dagegen zu.

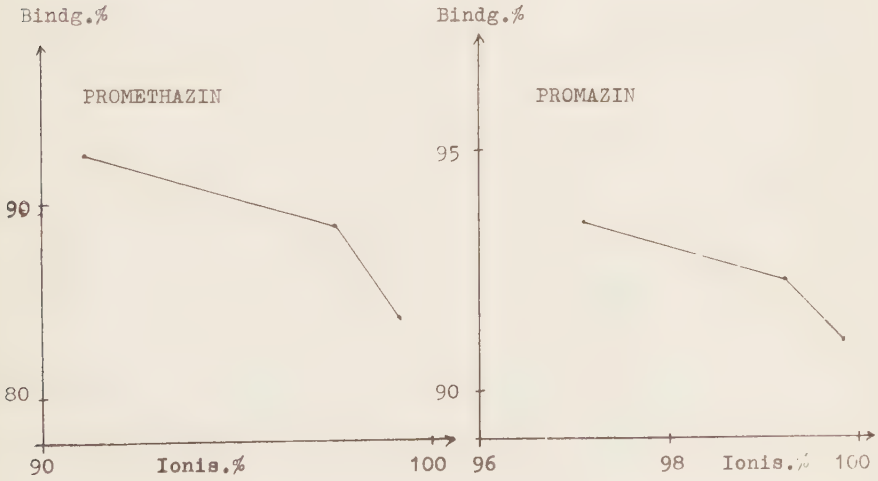
Abbildung 1: Verlauf der Bindungs- und der Ionisationskurven der untersuchten basischen Arzneistoffe

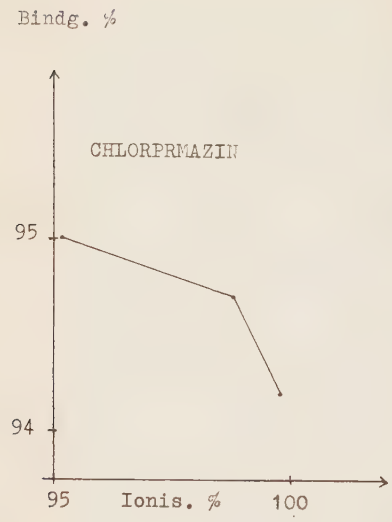


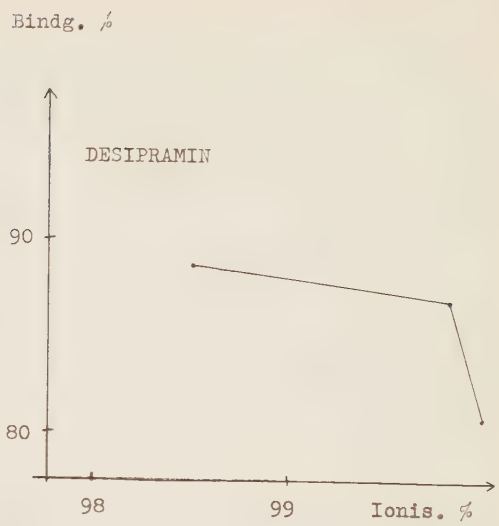


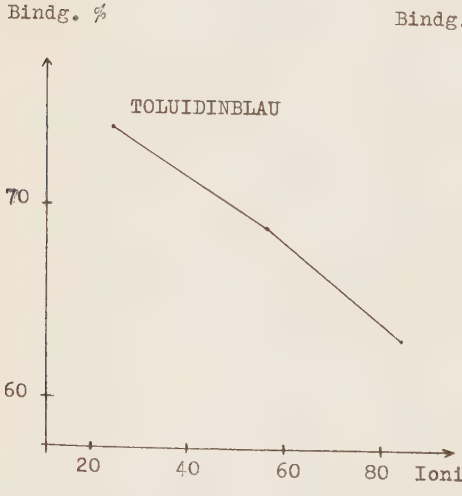
b) Die Bindung nimmt zwar mit sinkender Ionisation zu, jedoch nicht in unmittelbar reziproker Korrelation.

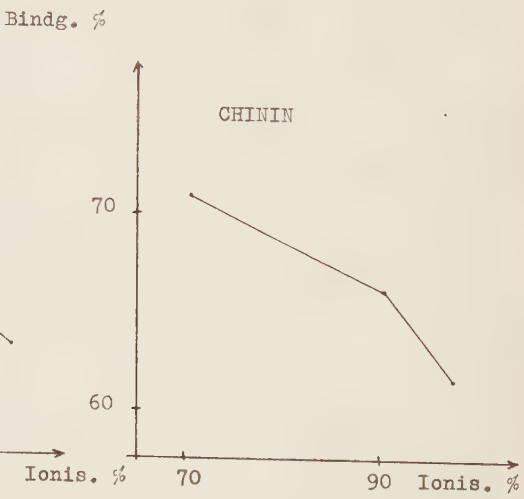
Abbildung 2: Korrelation von Bindungs- und Ionisations-änderung




Bindg. %
CHLORPRMAZIN
95
94
95
Ionis. %
100

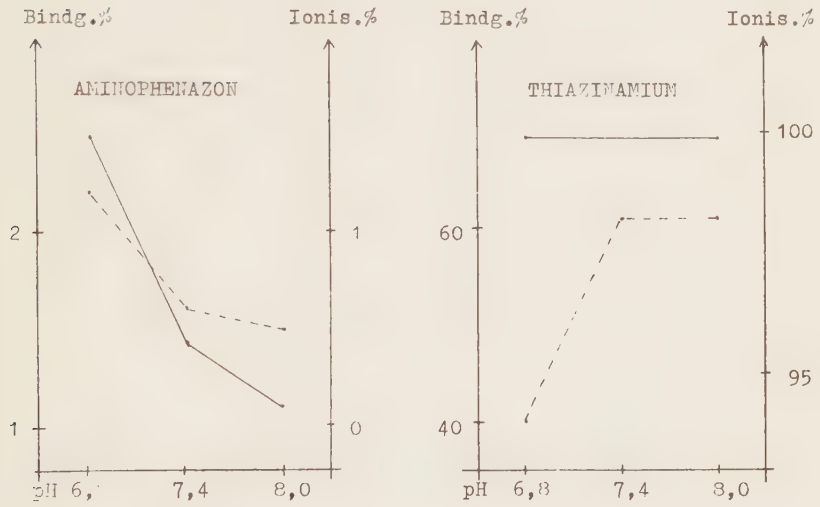

Bindg. %
DESIPRAMIN
90
80
98
99
Ionis. %


Bindg. %
TOLUIDINBLAU
70
60
20
40
60
80
Ionis. %


Bindg. %
CHININ
70
60
70
90
Ionis. %

c) Abweichendes Verhalten zeigen die beiden Basen Thiazinamium und Aminophenazon.
Thiazinamium liegt im untersuchten pH-Bereich vollständig ionisiert vor, ändert jedoch trotzdem seine Bindung im Sinne einer Zunahme, allerdings nur zwischen pH 6,8 und 7,4.
Aminophenazon ändert seine Ionisation, wenn auch nur unwesentlich, zeigt jedoch keinerlei signifikante Änderung seiner Bindung.

Abbildung 3: Verlauf der Bindungs- und der Ionisationskurven von Thiazinamium und Aminophenazon



In allen Abbildungen sind die Punkte unter Vereinfachung des tatsächlichen Kurvenverlaufes durch Geraden verbunden.

Anmerkungen zu:

a) Das Verhalten der Mehrzahl der untersuchten organischen Basen läßt an eine Beeinflussung der Bindung durch die Ionisation eben dieser Substanzen denken.
Eine Ionenbindung zwischen Pharmakon und Protein scheint jedoch wenig wahrscheinlich, da Ionisations- und Bindungsänderung in nahezu reziproker Korrelation zueinander stehen.
Eher vorstellbar wäre eine hydrophobe Wechselwirkung, zumal die ungeladenen Substanzmoleküle eine weit höhere Affinität zum Hämoglobin aufweisen als die geladenen Basenkationen.

c) Das Verhalten von Thiazinamium zwischen pH 7,4 und 8,0 (gleichbleibende Bindung bei gleichbleibender Ionisation) würde dieser Interpretation nicht widersprechen. Auffallend ist jedoch der starke Bindungsanstieg zwischen pH 6,8 und 7,4 trotz unveränderter Ionisation des Pharmakons.
Die Berechnung der Ionisationswerte von Thiazinamium geht allerdings von nur einer ionisierbaren Gruppe mit einem pK_a von 11,2 aus. Die Titration einer Thiazinamiumlösung zeigte jedoch, daß eine weitere ionisierte basische Gruppe mit einem pK_a von ca. 7,4 vorhanden sein muß (Kurz et al., 1978).
Dies mag erklären, warum Thiazinamium zwischen pH 6,8 und 7,4 abweichendes Bindungsverhalten zeigt.

Für Aminophenazon schließlich findet sich - bei über den gesamten untersuchten pH-Bereich praktisch nur unwesentlich veränderter Ionisation - eine ebensolche, nämlich gleichbleibende Bindung.

2) Versuch einer Erklärung der pH-Abhängigkeit der Bindungshöhe

a) anhand des Bindungstyps im Protein-Pharmakon-Komplex

Über die Natur der Eiweißbindung herrscht trotz der Vielzahl an Untersuchungen noch immer keine vollständige Klarheit. Zu viele Kräfte spielen in der Wechselwirkung niedermolekularer Substanzen mit Makromolekülen eine Rolle: Ionen- und Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselbeziehungen, van der Waals Kräfte, sterische Effekte u.v.a.m. (Bloom und Laubach 1962, Scholtan 1964, Krieglstein 1970).

Die früher meist vertretene Auffassung, daß die elektrische Ladung für die Bindung an Eiweiß allein von entscheidender Bedeutung sei (Scatchard 1949, Klotz und Urquart 1959, Keen 1966), wird von den meisten Autoren heute nicht mehr geteilt.
Sie scheidet überdies generell aus für Stoffe, die Nichtelektrolyte sind und trotzdem erheblich gebunden werden (Scholtan et al. 1966 u. 1968, Kiehs et al. 1966).

Eher vorstellbar ist die Beteiligung mehrerer verschiedener, sich gegenseitig beeinflussender Bindungstypen am Zustandekommen des Protein-Pharmakon-Komplexes, zumal Ionen wie ungeladene Moleküle gleichermaßen an Eiweiß gebunden werden können.

Viel diskutiert und in neueren Untersuchungen stark hervorgehoben wird die Bedeutung des hydrophoben Charakters der Substanzen für das Ausmaß ihrer Bindung an Protein (Bloom und Laubach 1962, Scholtan 1964 u. 1968, Hansch et al. 1965, Bird und Marshall 1967, Krieglstein und Kuschinsky 1968, Scheler 1969, Ali Mohammadzadeh 1967 u. 1969, Glaser u. Krieglstein 1970).

Eine solche hydrophobe Wechselwirkung beruht darauf, daß der Übertritt eines, verglichen mit Wasser, weniger polaren Moleküls aus der wässrigen Phase an die unpolaren Gruppen eines Proteins energetisch begünstigt ist.
Treibende Kraft bei der Ausbildung einer so gearteten Bindung stellt die Zunahme de Entropie dar (Kauzmann 1959, Scholtan 1964, Kiehs et al. 1966).

Der hydrophobe Charakter einer Substanz wird ausgedrückt durch ihren Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten VK. Vergleiche zwischen dem Ausmaß der Proteinbindung und dem Verteilungskoeffizienten sind nur innerhalb einer Substanzgruppe erlaubt, deren einzelne Vertreter sich nur in ihrem hydrophoben Charakter, nicht aber in ihren anderen physiko-chemischen Eigenschaften wesentlich unterscheiden.

So zeigt Tabelle 4 eine Gegenüberstellung der Bindungswerte und der Verteilungskoeffizienten VK der untersuchten Phenothiazine bei den drei pH-Stufen 6,8, 7,4 und 8,0.

		Bindung			VK	Oct./PO_4-Pu	
Substanz	pH	6,8	7,4	8,0	6,8	7,4	8,0
PROMETHAZIN		83,9%	88,8%	92,6%	238,3	266,0	320,3
PROMAZIN		91,1%	92,3%	93,5%	325,9	357,0	401,2
CHLORPROMAZIN		94,2%	94,7%	95,0%	318,5	350,0	401,8

Die Verteilungskoeffizienten von Promethazin und Chlorpromazin wurden bei pH 7,4 im Arbeitskreis Prof. Kurz bestimmt, derjenige von Promazin der Literatur entnommen (Staab und Krieglstein 1970).

Die Verteilungskoeffizienten bei pH 6,8 und 8,0 lassen sich nach folgender Gleichung errechnen (Appiah 1971):

$$VK_1 = \frac{1 + \text{antilog}(pH_2 - pK_a)}{1 + \text{antilog}(pH_1 - pK_a)} \cdot VK_2$$

Das Verhalten der angeführten Phenothiazine demonstriert recht deutlich, daß mit größer werdendem VK die Bindung an Hämoglobin zunimmt; das Bindungsausmaß einer Substanz also eng mit deren Lipophilie korreliert zu sein scheint.

Da bei den meisten organischen Basen die nicht ionisierte Form gut lipoidlöslich, die ionisierte Form dagegen weniger bzw. unlöslich ist, ist der Ionisationsgrad indirekt verantwortlich für das Ausmaß des lipoidlöslichen Substanzanteiles und damit letztlich für das Ausmaß der Bindung an Protein.
Mit steigendem pH geht aber bei Basen die Ionisation typischerweise zurück, während im selben Maße der Anteil nicht ionisierter, lipoidlöslicher Moleküle zunimmt.
Als Endergebnis resultiert so eine mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration steigende Bindung.

Die überragende Bedeutung hydrophober Wechselbeziehungen zeigt sich deutlich auch im Lösungsmitteleinfluß.
Karush (1964) konnte für Sulfonamide einen enormen Bindungsabfall nachweisen, nachdem er Dioxan oder Alkohol, die beide die Dielektrizitätskonstante der wässrigen Phase herabsetzen, dem System zugesetzt hatte.
Ähnliche Versuche von Scholtan et al. (1966) und Scheler (1969), sowie Kurz et al. (1977) weisen in dieselbe Richtung.

Obwohl mittlerweile die hydrophobe Bindung als einer der wichtigsten Faktoren im Bindungsprozeß erkannt und

als solcher unbestritten ist, sollte dennoch nicht außer acht gelassen werden, daß zusätzlich andere physiko-chemische Eigenschaften des untersuchten Arzneimittels wie des betreffenden Proteins für das Zustandekommen eines Eiweiß-Pharmakon-Komplexes von Bedeutung sein können (Kiehs et al. 1966, Ahtee et al. 1967, Scholtan 1968).

') anhand vergleichender Daten aus der Literatur

Während die Proteinbindung saurer Pharmaka bereits ausgiebig untersucht wurde und noch wird, sind die Kenntnisse über das Bindungsverhalten organischer Basen eher spärlich zu nennen (Borga et al. 1969). Dies gilt in noch weit höherem Maße für ihre Bindung an andere Proteine als die des Plasmas, wie beispielsweise an Hämoglobin.

So beziehen sich nahezu alle zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten auf die Bindung an Albumin. Lediglich Manne (unveröffentlicht) befaßt sich mit der pH-Abhängigkeit der Bindung an Hämoglobin. Allerdings greift auch er auf saure Pharmaka (Barbiturate und Phenylbutazonderivate) zurück.

Aus Mangel an direkt vergleichbaren Daten und aufgrund der von Kiehs et al. (1966) gefundenen Ähnlichkeit der beiden Bindungsprozesse, erscheint es daher zulässig, einige der zahlreich verfügbaren Albumindaten hier aufzuführen und sie den an Hämoglobin gefundenen Werten gegenüberzustellen.

1) Arbeiten über die pH-Abhängigkeit der Hämoglobinbindung

Manne (unveröff.) untersuchte die pH-Abhängigkeit der Hämoglobinbindung saurer Arzneimittel am Beispiel der Barbiturate und Phenylbutazonderivate.

Er fand für Barbiturate eine mit steigendem pH - also steigender Ionisation - abnehmende Bindungsfähigkeit und führt dies auf die herausragende Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkung für die Bildung eines Arzneimittel-Protein-Komplexes zurück.
Daß darüberhinaus weitere Bindungskräfte am Bindungsprozeß beteiligt sein müssen, sieht er im Verhalten der untersuchten Phenylbutazonderivate bestätigt. Diese, im untersuchten pH-Bereich vollständig ionisierten Verbindungen, zeigen zwar gleichfalls einen Rückgang ihrer Bindung an Hämoglobin, allerdings nur zwischen pH 7,4 und 8,0.

Die hydrophobe Wechselwirkung scheint also allein zur Charakterisierung des Bindungsausmaßes in Abhängigkeit vom pH nicht zu genügen.

b) Arbeiten über die pH-Abhängigkeit der Bindung an Serumproteine

Für die Albuminbindung sind in der Literatur sowohl eine Zunahme (Jardetzky 1965, Scholtan 1964, Goldbaum und Smith 1954, Mohr 1970) als auch eine Abnahme (Grollmann 1925, Teresi und Luck 1948, Scholtan 1964) der Bindungshöhe mit steigendem pH beschrieben.

Mohr (1970) untersuchte eine ganze Reihe von Arzneimitteln - auch basische - im Hinblick auf die pH-Abhängigkeit ihrer Bindung an Plasmaproteine und stellte für saure wie basische Pharmaka eine mit steigendem pH zunehmende Bindung fest.
Für Verbindungen, die im untersuchten pH-Bereich ihre Ionisation nicht ändern, fand er die erwartete Konstanz der Bindungshöhe.
Die von ihm für Barbiturate gefundene Korrelation

von Isosbestens- und Diskussionspunkte interpretiert er als Ausdruck einer möglichen Ionenbindung, wogegen er für die Bindungszunahme basischer Pharmaka Dispersionskräfte verantwortlich macht.
Substanzen, die ihre Ionisation nicht ändern, verändern ebensowenig ihre Konformation. Sie sind nach Mohr demnach auch bei verschiedenen pH-Werten denselben Dispersionskräften ausgesetzt und zeigen aus diesem Grunde keine Änderung ihrer Proteinbindung.

c) Arbeiten über die pH-Abhängigkeit der Bindung an Gewebeproteine

Bindungsstudien von Weitz (unveröff.) an Kaninchenmuskel zeigen Ergebnisse, die denen an menschlichem Hämoglobin analog sind: Bei steigendem pH sinkt das Ausmaß der Bindung bei Barbituraten und Phenylbutazonderivaten, dasjenige bei Basen steigt dagegen an.

d) Vergleich der an den verschiedenen Proteinen gefundenen Ergebnisse

Während saure Arzneimittel in Bezug auf die pH-Abhängigkeit ihrer Bindung an Plasmaproteine ein im Vergleich zu Hämoglobin und Gewebeprotein konträres Verhalten zeigen, steht die von Mohr (1970) festgestellte Bindungsabhängigkeit organischer Basen vom pH in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit:
Für die Bindung an Rinderplasmaproteine findet Mohr für alle Basen, die im untersuchten pH-Bereich ihre Ionisation ändern (verringern), einen Bindungsanstieg mit steigendem pH.

Das zwischen pH 6,8 und 8,0 vollständig ionisierte Thiazinamium zeigt auch in der zitierten Arbeit eine Zunahme seiner Bindung nur zwischen pH 6,8 und 7,4.
Eine dem Aminophenazon hinsichtlich seines Ionisationsausmaßes (0,6 - 0,5) vergleichbare Verbindung, das Anilin, weist nach Mohr ebenfalls keine signifikante Bindungsänderung auf.

3) anhand Überlegungen zu möglichen pH-bedingten Änderungen am Protein

Auf die Bedeutung hydrophober Wechselbeziehungen zwischen Arzneimittel und Protein wurde bereits eingehend hingewiesen.
Es wurde gleichfalls betont, daß über den lipophilen Charakter des beteiligten Arzneimittels hinaus andere Faktoren wie sterische Effekte und pH-bedingte Änderungen am Proteinmolekül eine nicht unwesentliche Rolle spielen könnten.

Bei einer Zunahme des pH über den isoelektrischen Punkt einer Proteinlösung hinaus wird die Ionisation möglicherweise zu einer ionischen Bindung befähigter kationischer Gruppen auf dem Protein zurückgedrängt (Scholtan 1964, Krieglstein und Kuschinsky 1968/69). Die Nettoladung des Moleküls kann dann mit zunehmendem pH negative Werte annehmen. Negativ geladene Säureanionen würden daher durch die ansteigende Negativität der Proteinoberfläche abgestoßen werden (Teresi und Luck 1948, Jardetzky 1965).
In analoger Weise würden die aufgeführten Änderungen am Protein die Bindung basischer Pharmaka bei steigendem pH begünstigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte tatsächlich ein mit steigendem pH vermehrtes Bindungsausmaß von kationischen Arzneistoffen nachgewiesen werden.
Dasselbe gilt für die Ergebnisse von Mohr an Rinderplasmaproteinen.

Eine mit steigendem pH zunehmende Bindung ließe auch an eine pH-abhängige, allgemeine Vermehrung der Bindungsstellen auf dem Protein denken.
Antonini et al. (1971) weisen jedoch darauf hin, daß für Hämoglobin eine Auffaltung mit nachfolgender Demaskierung titrierbarer Gruppen erst unterhalb pH 5 bzw. oberhalb pH 10 erfolgt.

Auch die Freilegung zusätzlicher, bindungsförnder, hydrophober Regionen des Proteins wäre denkbar, erscheint aber innerhalb des untersuchten pH-Bereiches unwahrscheinlich, nachdem Ali Mohammadzadeh et al. (1969) feststellten, daß die hydrophoben Regionen der Proteine im Innern verborgen sind und erst dann freiliegen, wenn die Nativstruktur des Proteins zerstört worden ist.
Somit wäre also erst nach milder Hydrolyse des Proteins eine starke Bindungszunahme zu erwarten. Eine hydrolytische Spaltung des Hämoglobins im untersuchten pH-Bereich erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Weber und Young (1964) machten die interessante Feststellung, daß intaktes Rinderserumalbumin in wesentlich höherem Maße niedermolekulare Substanzen bindet als seine isolierten Untereinheiten. Sie vermuten deshalb in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Kiehs et al. (1966) an Rinderhämoglobin, daß organische Verbindungen möglicherweise nicht im Innern einer bestimmten Untereinheit des Proteinmoleküls festgehalten werden, sondern vielmehr zwischen dessen Untereinheiten im hydrophoben Milieu.

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob und in welchem Ausmaß eine pH-Abhängigkeit der Bindung basischer Arzneimittel an Humanhämoglobin besteht. Welche Kräfte und sonstige Einflußgrößen an dieser Bindung im einzelnen beteiligt sind, läßt sich aus diesen Versuchen nicht exakt herleiten.
Die hydrophobe Bindung scheint am ehesten das Bindungsverhalten der untersuchten Substanzen zu charakterisieren.

IV. Schlußfolgerungen

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Ausmaß der Bindung besitzt neben seiner grundsätzlichen, theoretischen Bedeutung auch praktisches pharmakologisches Interesse.
Die pharmakokinetische Bedeutung der Bindung an Hämoglobin darf jedoch nicht allein nach deren Ausmaß beurteilt werden.
Voraussetzung für eine Bindung an Hämoglobin in vivo ist, daß das Pharmakon in die Erythrozyten eindringen kann. Neben seinen Eigenschaften, an Hämoglobin gebunden werden zu können, muß das Arzneimittel also auch Eigenschaften besitzen, die es ihm ermöglichen, die Erythrozytenmembran zu passieren.
Schanker et al. (1961) beschreiben die Erythrozytenmembran als Lipoproteidmembran, die von positiv geladenen Poren unterschiedlichen Durchmessers durchbrochen ist. Diese Membran läßt bevorzugt Anionen - gleichgültig, ob hoher oder niedriger Lipoidlöslichkeit - hindurchtreten.
Für Kationen (Basen) ist dieselbe Membran dagegen nur nach Maßgabe ihrer Lipoidlöslichkeit durchlässig, da ihnen der Weg durch die positiv geladenen Poren versperrt ist.

Die Lipoidlöslichkeit und damit indirekt der Ionisationsgrad der betreffenden Substanz stellen also die entscheidenden Determinanten für die Passage der Erythrozytenmembran dar.

Basen mit hohem Verteilungskoeffizienten wie Promethazin, Promazin und Chlorpromazin werden deshalb schnell in die Erythrozyten eindringen. Ahtee und Paasonen (1966) konnten dies für Chlorpromazin tatsächlich bestätigen, indem sie in Erythrozyten eine doppelt so große Menge der Substanz wie im Plasma nachweisen konnten.

Basen mit niedrigem Verteilungskoeffizient wie beispielsweise Aminophenazon oder Chinin werden die Erythrozytenmembran dagegen nur langsam, wenn überhaupt passieren. Da bei organischen Basen laut Schanker et al. (1961) in der Hauptsache die nicht ionisierte Form zur Permeation fähig ist, steht zu vermuten, daß mit steigendem pH die Permeationsfähigkeit aller organischen Basen zunimmt und damit die Möglichkeit einer Bindung an Hämoglobin allgemein begünstigt wird.

Normalerweise hält jedoch der menschliche Körper die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes streng konstant. Gross und Schölmerich (1976) geben als physiologischen pH-Bereich die Werte 7,39 bis 7,45 an.
Mit einer pH-bedingten Änderung der Hämoglobinbindung wird daher in den meisten Fällen nicht zu rechnen sein. Es gibt allerdings Krankheitsbilder, bei denen es zu merklichen Verschiebungen im Säure-Basen-Haushalt kommen kann. Solche sind z.B.:

Acidose		
	metabolisch	z.B. diab. Koma, Arzneimittelintoxikation, schwere Hypoxie, Niereninsuffizienz, Diarrhoe

Acidose		
	respiratorisch	z.B. Depression des Atemzentrums durch Arzneimittel, durch Encephalitis, Hirndruck, eingeschränkte Funktion der peripheren Atemwege, durch Emphysem, Bronchiektasien.
Alkalose		
	metabolisch	z.B. durch Erbrechen, Kaliummangel oder Bicarbonatanstieg.
	respiratorisch	z.B. durch Reizung des Atemzentrums infolge Fieber, Stoffwechselsteigerung, Bakteriämie.

Davon tritt die anhaltende Acidose häufiger auf als die - abgesehen von chronischen Kaliummangelzuständen - sehr seltene Alkalose (Siegenthaler 1973).
Gelingt es den entsprechenden Regulationssystemen des Körpers nicht mehr, die Störungen im Säure-Basen-Haushalt auszugleichen, gerät der pH-Wert des Blutes außerhalb der Normgrenzen.
Leuthard (1966) gibt pH 6,96 bzw. 7,8 als die extremsten Werte an, die in einer solchen Situation je bei einem Patienten gemessen wurden.

Tabelle 5 zeigt die bei den extremen pH-Werten 6,8 und 8,0 auftretenden Veränderungen des pharmakologisch wichtigen freien Anteils der untersuchten Substanzen.
Der freie Anteil im physiologischen pH-Bereich dient als Bezugspunkt und wurde gleich 100% gesetzt.

Tabelle 5: Änderung des freien Anteils bei Änderung der Wasserstoffionenkonzentration

Substanz	pH 6,8	7,4	8,0
PROMETHAZIN	+ 43,7%	100%	- 33,9%
PROMAZIN	+ 15,6%	100%	- 15,6%
CHLORPROMAZIN	+ 9,4%	100%	———
DESIPRAMIN	+ 45,6%	100%	- 11,9%
TOLUIDINBLAU	+ 11,1%	100%	- 16,7%
CHININ	+ 13,5%	100%	- 14,2%
AMINOPHENAZON	———	100%	———
THIAZINAMIUM	+ 54,2%	100%	———

Versucht man nun, diese Daten auf in vivo Erwartungen zu extrapolieren, so sollte man sich stets vor Augen halten, daß

1) nur im Falle hoch gebundener Substanzen Proteinbindung von praktischer pharmakologischer Bedeutung sein kann, denn lediglich Protein-Pharmakon-Komplexe außergewöhnlicher Stabilität sind nachgewiesenermaßen in der Lage, die Arzneimittelmenge, die im Körper in der aktiven, diffusiblen, ungebundenen Form vorliegt nennenswert zu reduzieren (Meyer und Guttmann 1968).

2) das Blutvolumen nur einen relativ kleinen Anteil des für die Arzneimittelverteilung zur Verfügung stehenden Raum-es darstellt.

Blutvolumen und Gesamtkörperwasser machen typischerweise 8 bzw. 60% des Körpergewichtes aus, sodaß - so betrachtet - der freie Anteil des Pharmakons im Blut außerdem mit einem zusätzlichen Volumen im Gleichgewicht steht, einem Volumen, das das achtfache des Blutvolumens beträgt.

Meyer und Guttmann (1968) weisen mit Recht darauf hin, daß die allgemeine Bedeutung des Phänomens Bindung für das Verhalten von Arzneimitteln im Körper nicht überschätzt werden sollte.
Dennoch erscheint es zulässig - unter Berücksichtigung oben genannter Kautelen - am Beispiel des Promethazins folgendes Rechenexempel durchzuführen:
Bei einem pH-Abfall des Hämolysates (25 ± 1 g/100 ml) von 7,4 auf 6,8 nehme der freie Anteil der Substanz infolge des Rückgangs der Bindung an Hämoglobin um 43,7% zu. Verteilt er sich nun im Blut und diffundiert ins Interstitium und in die Zellen, so ist im Endeffekt eine Zunahme des freien, pharmakologisch wichtigen Anteils um schätzungsweise 3 - 4% des Ausgangswertes zu erwarten. Nicht berücksichtigt dabei ist der sich aufgrund abnehmender Bindung an die Proteine des Plasmas ergebende zusätzliche Anstieg des freien Anteils, sowie der in Geweben lokalisierte Pharmakonanteil, der erheblich sein kann, woraus sich weitere Abweichungen ergeben könnten.

Eine Änderung der Hämoglobinbindung und/oder der Muskelproteinbindung bedeuten jedoch - verglichen mit dem Einfluß einer um den gleichen relativen Betrag veränderten Plasmaproteinbindung - eine wesentlich stärkere Verschiebung der Mengenverhältnisse (3 bzw. 30fache Massen!).

Somit erscheint bei hoch gebundenen Pharmaka ein Einfluß des Blut-pH auf die pharmakologische Wirksamkeit zumindest vorstellbar.
Desgleichen wäre ein gehäuftes Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen wie auch ein Wirkungsabfall durch beschleunigte Elimination - beides aufgrund einer pH-bedingten Freisetzung aus der Eiweißbindung - zu diskutieren.

IV. Zusammenfassung

Mittels Gleichgewichtsdialyse wurde die Bindung von acht basischen Arzneimitteln an Humanhämoglobin bestimmt.
Die Wasserstoffionenkonzentration wurde variiert (pH 6,8, 7,4 und 8,0) und ihr Einfluß auf das Bindungsausmaß der untersuchten Substanzen festgestellt.

Für die Mehrzahl der Basen war mit steigendem pH ein Bindungsanstieg zu verzeichnen.
Desipramin und Thiazinamium zeigten eine vermehrte Bindung nur im Bereich pH 6,8 und 7,4, Aminophenazon wies keinerlei signifikante Bindungsänderung auf.

Das Bindungsverhalten der untersuchten Pharmaka läßt eine Abhängigkeit von der Ionisation bzw. dem Verteilungskoeffizienten der betreffenden Substanzen erkennen.

Zur Beschreibung der Bindungskräfte reicht die hydrophobe Wechselbeziehung allein nicht aus.

Vielmehr sind andere Bindungsarten, sterische Einflüsse und pH-bedingte Veränderungen am Hämoglobinmolekül mit in Rechnung zu stellen.

Die Bedeutung der Hämoglobinbindung liegt in der im lebenden Organismus vorhandenen Menge des Trägerproteins.

Pharmakologische Effekte einer veränderten Wasserstoffionenkonzentration sind vor allem dann zu erwarten, wenn zugleich mit der Hämoglobinbindungsänderung eine gleichsinnige Änderung der Gewebebindung auftritt.

VII. Literatur

1. AARON, H. ANTON
   A drug-induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides
   J. Pharmakol. 134, 291 - 303 (1961)

2. AHTEE, L., PAASONEN, M.K.
   Distribution of some phenothiazines in red blood cells and platelets
   J. Pharm. Pharmacol. 18, 126 - 128 (1966)

3. AHTEE, L., MATTILA, M.J., VAPAATALO, H.I.
   The binding of some phenthiazines to human serum in vitro
   Biochem.Pharmacol. 16,II, 2432 - 2435 (1967)

4. ALI MOHAMMADZADEH-K., FEENEY, R.E., SAMUELS, R.B., SMITH, L.M.
   Solubility of alkanes in protein solutions
   Biochem.Biophys.Acta 147, 583 - 589 (1967)

5. ALI MOHAMMADZADEH-K., FEENEY, R.E., SMITH, L.M.
   Hydrophobic binding of hydrocarbons by proteins
   Biochem.Biophys.Acta 194, 246 - 264 (1969)

6. ANTONINI, E., BRUNORI, M.
   Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands S. 2, 104, 107 (1971)
   North Holland Publ. Comp., Amsterdam, London

7. APPIAH, A.K.
   Eignung verschiedener Verteilungsmodelle zur Beurteilung der Permeabilität biologischer Membranen für Arzneimittel
   Dissertation München (1971) Pharmakol. Institut

8. BAUR, G., FURZ, H., PAULK, H.
Alteration of Protein-Binding during Storage of Human Plasma Preparations
im Druck

9. BEUMHOLD, H., KYLIN, E., RUSZNYAK, St.
Die Eiweißkörper des Blutplasmas
S. 230 - 303
Verlag Th. Steinkopff, Dresden, Leipzig (1938)

10. BIRD, A.E., MARSHALL, A.C.
Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients
Biochem.Pharmacol. 16, 2275 - 2290 (1967)

11. BLOOM, B.M., LAUBACH, G.D.
The relationship between chemical structure and pharmacological activity
Ann.Rev.Pharmacol. 2, 67 - 108 (1962)

12. BORGA, O., AZARNOFF, D.L., FORSHELL, G.P., SJÖQVIST, F.
Plasma protein binding of tricyclic antidepressants in man
Biochem.Pharmacol. 18,II, 2135 - 2143 (1969)

13. BRODIE, B.B., AXELROD, J.
The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material
J.Pharmacol. 99, 171 - 184 (1950)

14. EVELYN, K.A., MALLOY, H.T.
Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood
J.Biolog.Chem. 126, 655 - 662 (1938)

15. FRICK, P.G.
Der Erythrozyt als Beispiel biologischer Zweckmäßigkeit
Schweizer Medizin. Wschr. 91, 1245 - 1249 (1961)

16. FRIEMEL, G.
Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten
Dissertation München (1968) Pharmakol. Institut

17. GARN, F.W., KIMBEL, K.H.
Verbleib und Ausscheidung von Depot-Sulfonamiden
Arzneimittel-Forschung 11, 701 - 707 (1961)

18. GLÄSER, H., KRIEGLSTEIN, J.
Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit trizyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer chemischen Konstitution
Arch.Pharmakol. 265, 321 - 334 (1970)

19. GOLDBAUM, L.R., SMITH, P.K.
The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relations to their disposition and pharmacological actions
J.Pharmacol. 111, 197 - 209 (1954)

20. GOLDSTEIN, A.
The interaction of drugs and plasma proteins
Pharmacol.Rev. 1, 102 - 165 (1949)

21. GREEN, A.L.
Ionization constants and water solubilities of some aminoalkylphenothiazine tranquillizers and related compounds
J.Pharm.Pharmacol. 19, 10 - 16 (1967)

22. GROLLMANN, A.
The combination of phenol red and proteins
J.Biol.Chem. 64, 141 - 160 (1925)

23. GROSS, R., SCHÖLMERICH, P.
Lehrbuch der Inneren Medizin
S. 859
Schattauer Verlag, Stuttgart / New York (1977)

24. HANSCH, C., KIEHS, K., LAWRENCE, G.L.
The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins
J.Americ.Chem.Soc. 87, 5770 (1965)

25. HAVEMANN, R., JUNG, F., v.ISSEKUTZ, B.
Die Bestimmung von Methämoglobin im Blute mit dem lichtelektrischen Kolorimeter
Biochem. Zeitschrift 301, 116 - 124 (1939)

26. HILZENBECHER, C.
Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin
Dissertation aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München (1972)

27. HUTCHINSON, C.
The behavior of human erythocytes in aequous alcohol solutions
Arch.Biochem.Biophys. 38, 35 - 41 (1952)

28. JACOBS, M.H.
Ergeb.Biol. 7, 1
vgl. Zitat in Kiehs et al. (1966)

29. JARDETZKY, O., WADE-JARDETZKY, N.G.
On the mechanism of the binding of sulfonamide to the bovine serum albumin
Molecular Pharmacology 1, 214 - 230 (1965)

32. JOSEPHSON, E.S., UDENFRIEND, S., BRODIE, B.B.
The estimation of basic organic compounds in biological material
J.Biol.Chem. 162, 341 - 344 (1947)

33. [illegible]
Zitat in Scholtan, Arzneimittel-Forschung 14, 348 und 469 - 473 (1964) siehe dort

34. KAUZMANN, W.
Some factors in the interpretation of protein denaturation
Advanc.Prot.Chem. 14, 1 - 57 (1959)

35. [illegible], E.M.
The displacement of three anionic drugs from binding to bovine serum albumin by various anionic compounds
Brit.J.Pharmacol.Chemoth. 26, 704 - 712 (1966)

36. KIEHS, K., HANSCH, H., MOORE, L.
The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin
Biochem. 5, 2602 - 2605 (1966)

37. KLOTZ, J.M., URQUARDT, J.H.
The binding of organic ions by proteins. Buffer effects.
J.Phys.Colloid.Chem. 53, 100 - 109 (1949)

38. KRIEGLSTEIN, J., KUSCHINSKY, G.
Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten mit Rinderserumalbumin
Arch.Pharmak.exp.Path. 262, 1 - 16 (1968/69)

37. KRIEGLSTEIN, J.
Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Klinische Wschr. 47, 1125 - 1130 (1969)

38. KRIEGLSTEIN, J.
Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration
Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie
Band 252 : Heft 4/5 S.11 (1970)

Korrelation der Octanol-Wasser-Verteilungs-Koeffizienten einiger trizyklischer Psychopharmaka mit deren Albuminbindung
Band 252 : Heft 4/5 S.13 (1970)

39. KURZ, H.
Analytische Probleme bei der Bestimmung der Protein-bindung durch Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Dialyse

Eignung von Verteilungsmodellen zur Beurteilung der Permeation von Arzneimitteln durch biologische Membranen

Beilage zu einem Teil der Auflage der Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie
Band 252 : Heft 4/5 S.9 (1970)

40. KURZ, H., TRUNK, H., WEITZ, B.
Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27 (II), 7, 1373-1380 (1977)

41. KURZ, H., BUCZOWSKY, B., HÜTTL, V., KLINEK, H., MOHR, E., VOGELSANG, H.-G.
Influence of hydrogen ion concentration on protein-binding
Zur Veröffentlichung vorbereitet (1978)

42. LEUTHARDT, F.
Lehrbuch der physiologischen Chemie
S. 585 - 586
Verlag Walter de Gruyter und Co., Berlin (1959)

43. MANNE, W.W.
noch nicht veröffentlicht

44. MARSHALL , P.B.
Some chemical and physical properties associated with histamin antagonism
Brit.J.Pharmacol. 10, 270 - 278 (1955)

45. MARTIN, B.K.
Potential effect of the plasma proteins on drug distribution
Nature, London 207, 274 - 276 (1965)

46. MEYER, M.C., GUTTMANN, D.E.
The binding of drugs by plasma proteins
J.pharmaceut.Sci. 57, 895 - 916 (1968)

47. MOHR, E.
Die Abhängigkeit der Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine von der Wasserstoffionenkonzentration
Dissertation aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München (1970)

48. NETTER, H.
Theoretische Biochemie
S. 290 S. 312
Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg (1959)

49. PERRIN, D.D.
Dissociation constants of organic bases in aequous solution
S. 441
Butterworths, London (1965)

50. RAUEN, H.M.
Biochemisches Taschenbuch
S. 237
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1956)

51. SCATCHARD
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660 - 674 (1949)

52. SCHANKER, L.S., SHORE, P.A., BRODIE, B.B.
Absorption of drugs from the stomach
J.Pharmacol. 120, 528 - 539 (1957)

53. SCHANKER, L.S.
Mechanism of drug absorption and distribution
AnnualRev.Pharmacol. 1, 29 - 44 (1961)

54. SCHANKER, L.S., NAFPLIOTIS, P.A., JOHNSON, J.M.
Passage of organic bases into human red cells
J.Pharmacol. 133, 325 - 331 (1961)

55. SCHANKER, L.S.
Passage of drugs across body membranes
Pharmacol.Rev. 14, 501 - 530 (1962)

56. SCHANKER, L.S., JOHNSON, J.M., JEFFREY, J.J.
Rapid passage of organic anions into human red cells
Am.J.Physiol. 207, 503 - 508 (1964)

57. SCHELER, W.
Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie
S. 232 - 250
G. Fischer Verlag, Jena (1969)

58. SCHÖNBORN, B.P.
Binding of xenon to horse hemoglobin
Nature, London 208, 760 (1965)

59. SCHOLTAN, W.
Die Bindung von Langzeit-Sulfonamiden an die Eiweißkörper des Serums (1961)
2. Mitteilung, Arzneimittel-Forschung 11, 707 - 720

60. SCHOLTAN, W.
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißköper
3. Mitteilung, 1. und 2. Teil
Arzneimittel-Forschung 14, 348 und 469 - 473 (1964)

61. SCHOLTAN, W.
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper
6. Mitteilung
Arzneimittel-Forschung 15, 1433 - 1441 (1965)

62. SCHOLTAN, W., SCHLOSSMANN, K., ROSENKRANZ, K.
Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalis-Präparaten mittels der Ultrazentrifuge
Arzneimittel-Forschung 16, 109 - 118 (1966)

63. SCHOLTAN, W., GLOXHUBER, C.U.
Die Bindung von Bilirubin und Bromsulfalein
Arzneimittel-Forschung 16, 520 - 528 (1966)

64. SCHOLTAN, W.
Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure
Arzneimittel-Forschung 18, 505 - 517 (1967)

65. SIEGENTHALER, W.
Klinische Pathophysiologie
S. 217
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1973)

66. STAAB, J., KRIEGLSTEIN, J.
Die Beteiligung der basischen Seitenkette von Phenothiazinderivaten an deren Albuminbindung
Arch.Pharmakol. 266, 456 - 457 (1970)

67. TERESI, J.D., LUCK, J.M.
The combination of organic anions with serum albumin
J.Biol.Chem. 174, 653 - 661 (1948)

68. THIEME, H.
Zur Analytik einiger therapeutisch verwendeter Phenothiazinderivate
3. Mitteilung: Beitrag zur photometrischen Bestimmung
Die Pharmazie 11, 725 - 726 (1956)

69. TOYKA, G.
Gegenseitige Beeinflussung von Pharmaka bei ihrer Bindung an Humanhämoglobin
Dissertation aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München (1974)

70. WEBER, G., YOUNG, L.B.
Fragmentation of bovine serum albumin by pepsin
J.Biol.Chem. 239, 1415 - 1431 (1964)

71. WECKBACH
noch nicht veröffentlicht

72. WEITZ, B.
noch nicht veröffentlicht

L E B E N S L A U F

ELISABETH MAUCHER

geboren am 28. Juni 1949 in Riedlingen/Württ. als Tochter des Bäckermeisters Otto Maucher und seiner Ehefrau Maria, geb. Gulde.

SCHULEN

1956 - 1960 Volksschule Riedlingen
1960 - 1968 Gymnasium Riedlingen

Reifeprüfung: 22. Juni 1968

BERUFSAUSBILDUNG

Sept. 1968 - Aug. 1970 Pharmazeut. Praktikum in der Engel-Apotheke, Dr. W. Klein, Ulm/Donau

Vorexamen Pharmazie: 18. Sept. 1970

Ws 70/71 - SS 73 Studium der Pharmazie an der Universität (TH) Karlsruhe

Staatsexamen Pharmazie: Okt. 1973

Approbation: 3. Dez. 1973

Seit SS 74 Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München

Ärztl. Vorprüfung: 21. März 1975

Erster Abschnitt der Ärztl. Prüf.: 30. März 1976

Zweiter Abschnitt der Ärztl. Prüf.: 17. März 1978

SS 78 Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Dritter Abschnitt der Ärztl. Prüf.: 30. April 1979